



P.B. 5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

**Europäisches
Patentamt**

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

**European
Patent Office**

Branch at
The Hague
Search
division

**Office européen
des brevets**

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Strehl Schübel-Hopf & Partner
Maximilianstrasse 54
80538 München
ALLEMAGNE

Erhalten
09. DEZ. 2002
Strehl et al.

Datum/Date

05.12.02

Zeichen/Ref./Ref.

EPA-53816

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°./Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

01932249.4-2114-JP0104366

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

Ajinomoto Co., Inc.

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

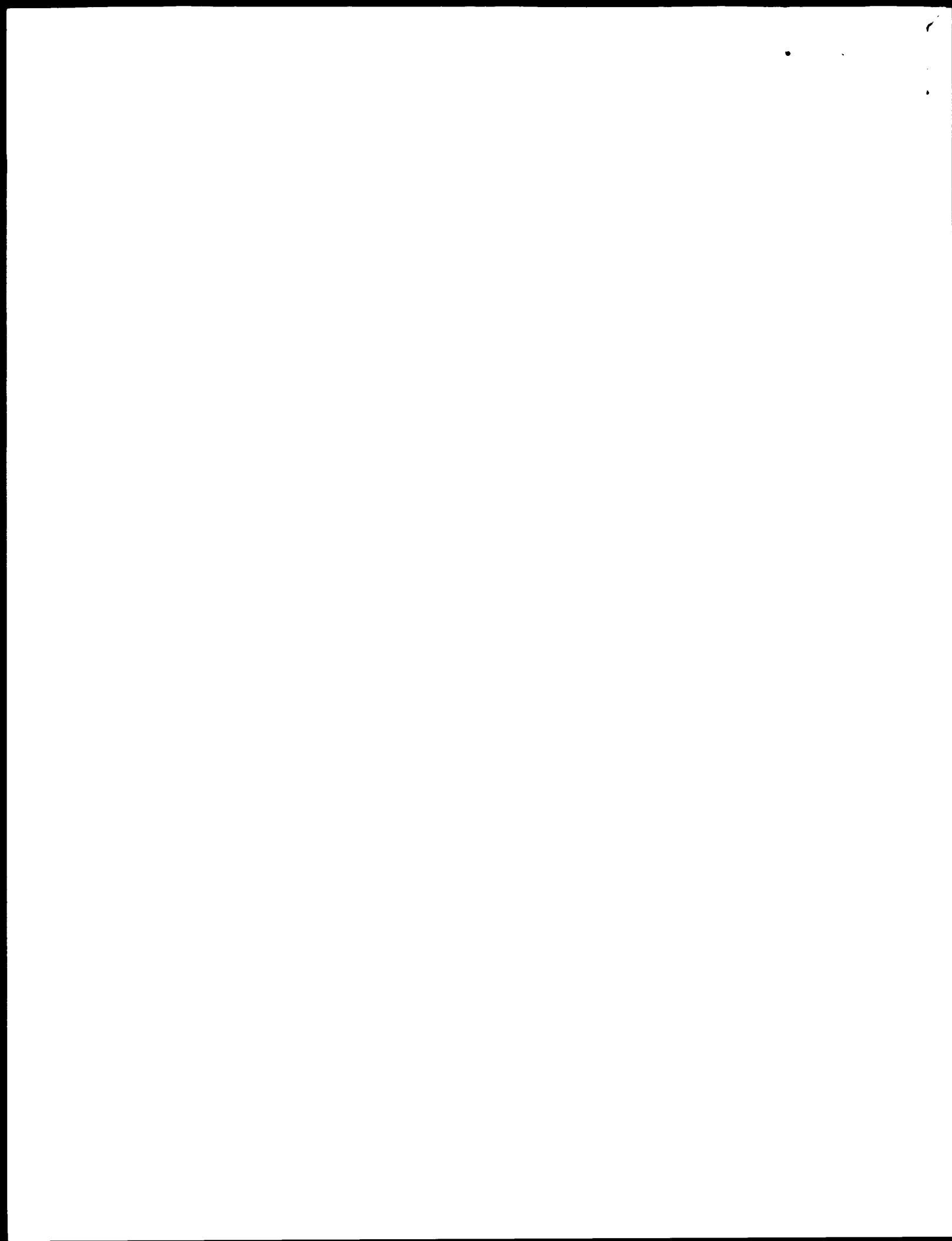
If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☐ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.







European Patent
Office

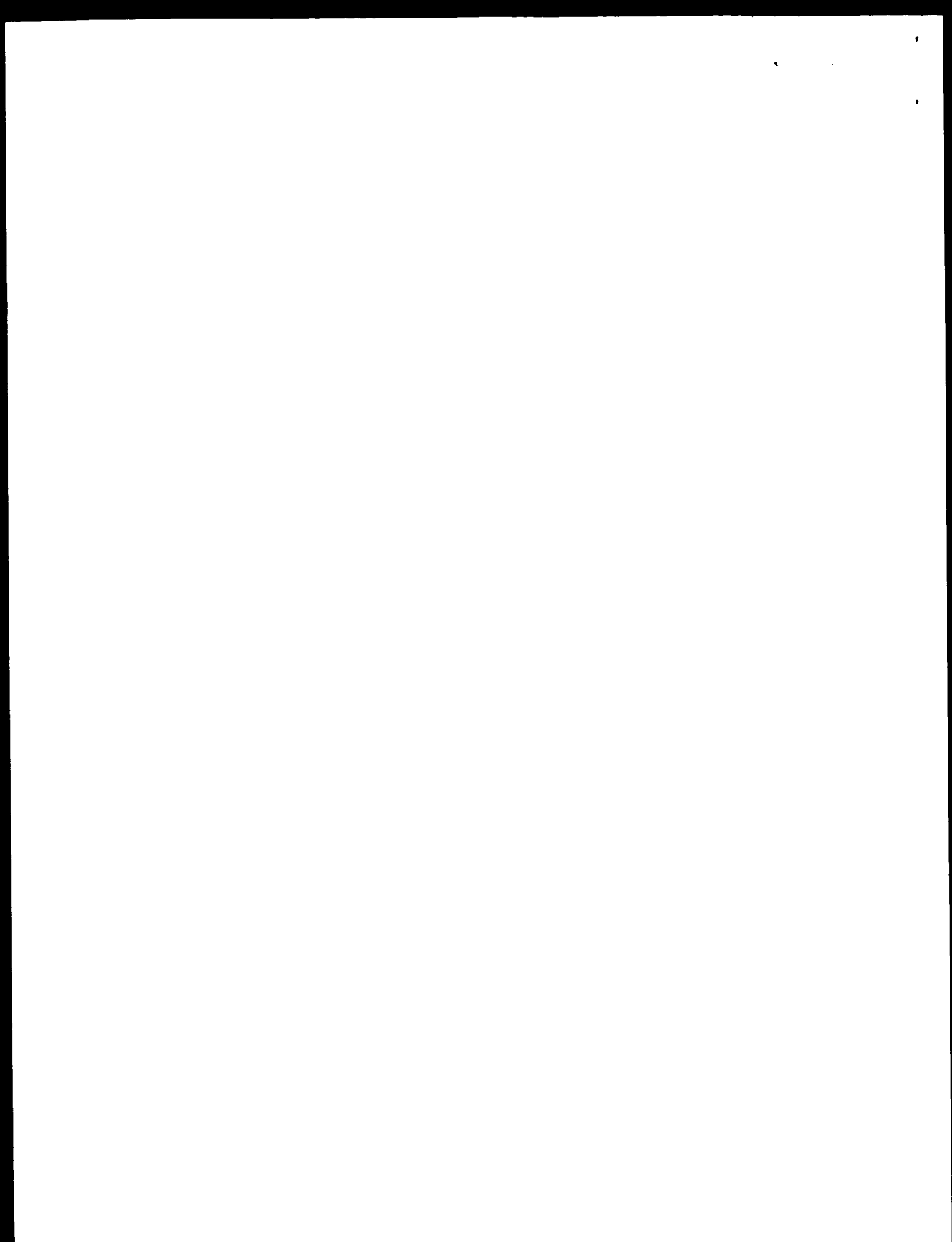
SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 01 93 2249

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT															
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)												
X,P	WO 00 30474 A (ISHIGURO KYOUSUKE ;NISHIMURA YASUSHI (JP); NISHIUCHI HIROAKI (JP);) 2 June 2000 (2000-06-02) The cited passages below are those as found on EP 1 142 493 A1, which is deemed to be a true translation of WO 00/30474: * examples 1,2,5-7 * * page 2, line 5-49 * * page 4, line 8-29 * ---	1-3,5,6	C12N9/00 C12P13/04 C12P1/02 //A23L1:28												
X	OHTAKE Y ET AL: "Isolation and characterization of glutathione biosynthesis-deficient mutants in Saccharomyces cerevisiae" AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 54, no. 12, 1990, page 3145-3150 XP001120475 * page 3147, column 1, paragraph 1 * * page 3148, column 1-2 * * page 3149, column 1; table III * * page 3150, column 1, paragraph 2 * ---	1-3,5,6													
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN & JP 04 066069 A (AJINOMOTO CO), 2 March 1992 (1992-03-02) * abstract * ---	5													
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN & JP 61 074596 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD), 16 April 1986 (1986-04-16) * abstract * ---	1-6													
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN & JP 08 228714 A (AJINOMOTO CO INC), 10 September 1996 (1996-09-10) * abstract * -----	1-6													
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.															
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 22 November 2002	Examiner Couzy, F												
<table border="0"><tr><td>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</td><td>T : theory or principle underlying the invention</td></tr><tr><td>X : particularly relevant if taken alone</td><td>E : earlier patent document, but published on, or after the filing date</td></tr><tr><td>Y : particularly relevant if combined with another document of the same category</td><td>D : document cited in the application</td></tr><tr><td>A : technological background</td><td>L : document cited for other reasons</td></tr><tr><td>O : non-written disclosure</td><td></td></tr><tr><td>P : intermediate document</td><td>& : member of the same patent family, corresponding document</td></tr></table>				CATEGORY OF CITED DOCUMENTS	T : theory or principle underlying the invention	X : particularly relevant if taken alone	E : earlier patent document, but published on, or after the filing date	Y : particularly relevant if combined with another document of the same category	D : document cited in the application	A : technological background	L : document cited for other reasons	O : non-written disclosure		P : intermediate document	& : member of the same patent family, corresponding document
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS	T : theory or principle underlying the invention														
X : particularly relevant if taken alone	E : earlier patent document, but published on, or after the filing date														
Y : particularly relevant if combined with another document of the same category	D : document cited in the application														
A : technological background	L : document cited for other reasons														
O : non-written disclosure															
P : intermediate document	& : member of the same patent family, corresponding document														

5

EPO FORM 1503 03 B2 (P04C04)



**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 01 93 2249

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

22-11-2002

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0030474	A	02-06-2000	BR 9914584 A CN 1324218 T EP 1142493 A1 WO 0030474 A1	23-10-2001 28-11-2001 10-10-2001 02-06-2000
JP 04066069	A	02-03-1992	JP 2903659 B2	07-06-1999
JP 61074596	A	16-04-1986	NONE	
JP 08228714	A	10-09-1996	NONE	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

TOYAMA, Tsutomu
Yokoyama Building 6th floor
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0004
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 21 June 2001 (21.06.01)	
Applicant's or agent's file reference B751SMOP1193	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP01/04366	International filing date (day/month/year) 24 May 2001 (24.05.01)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 25 May 2000 (25.05.00)
Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
25 May 2000 (25.05.00)	2000-155121	JP	08 June 2001 (08.06.01)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Shinji IGARASHI

Telephone No. (41-22) 338.83.38



PATENT COOPERATION TREATY

WO 01/90310
PCT/JP01/04366

PCT

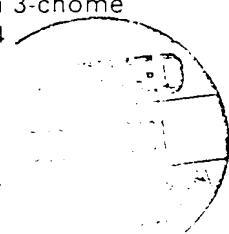
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TOYAMA, Tsutomu
Yokoyama Building 6th floor
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0004
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 29 November 2001 (29.11.01)			
Applicant's or agent's file reference B751SMOP1193			
International application No. PCT/JP01/04366		International filing date (day/month/year) 24 May 2001 (24.05.01)	
Priority date (day/month/year) 25 May 2000 (25.05.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has **communicated**, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:
KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
BR,CN,EP,ID,IN,JP,SG

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 29 November 2001 (29.11.01) under No. WO 01/90310

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and the PCT Applicant's Guide, Volume II.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer <p style="text-align: center;">J. Zahra</p>
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.91.11



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年11月29日 (29.11.2001)

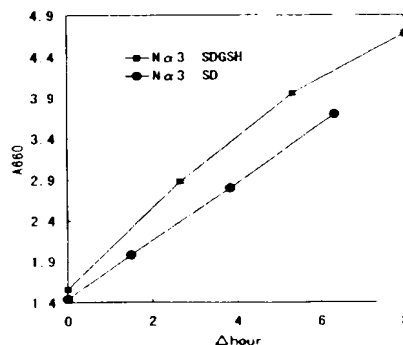
PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/90310 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 1/16. [JP/JP] 杉本 玲子 (SUGIMOTO, Reiko) [JP/JP] 上田 要一 (UEDA, Yoichi) [JP/JP] 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 食品研究所内 Kanagawa (JP).
1/19, 15/52, C12P 1/02 // A23L 1/28
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/04366
- (22) 国際出願日: 2001年5月24日 (24.05.2001) (74) 代理人: 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.): 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 / 国内: BR, CN, ID, IN, JP, KR, SG, US.
- (30) 優先権データ: 特願2000-155121 2000年5月25日 (25.05.2000) JP (84) 指定国 / 広域: ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP] 〒104-8315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP). 添付公開書類: 国際調査報告書
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西内博章 (NISHI-UCHI, Hiroaki) [JP/JP] 佐野公一朗 (SANO, Kouichiro) 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING γ -GLUTAMYL-CYSTEINE

(54) 発明の名称: γ -グルタミルシステインの製造法



(57) Abstract: A yeast extract is produced by using a *Saccharomyces cerevisiae* strain which can contain 1% by weight or more of γ -glutamylcysteine in the logarithmic growth phase and contains from 0.004 to 0.1% by weight of glutathione when cultured in a medium wherein a glutathione synthase-lacking strain of *S. cerevisiae* grows more slowly than wild-type *S. cerevisiae* (for example, an *S. cerevisiae* strain lacking the C-terminal domain following Arg at the 370-position of glutathione synthase encoded by glutathione synthase gene at the chromosome).

[続葉有]



WO 01/90310 A1



(57) 要約:

サッカロマイセス・セレビスエの野生株よりもグルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地で培養したとき、その対数増殖期に、 γ -グルタミルシステインを1重量%以上含有することができ、かつ、グルタチオンを0.004重量%~0.1重量%の範囲で含有するサッカロマイセス・セレビスエ、例えば染色体上のグルタチオン合成酵素遺伝子によってコードされるグルタチオン合成酵素が、370位のアルギニン残基以降のC末端側の領域を欠失しているサッカロマイセス・セレビスエを用いて酵母エキスを製造する。

明細書

γ-グルタミルシステインの製造法

技術分野

本発明は、γ-グルタミルシステイン含量の高い酵母及び酵母エキス、並びに同酵母を育種する方法に関する。γ-グルタミルシステイン、及びそれから製造されるシステインは、食品分野で有用である。

背景技術

システインは、食品の風味改善などを目的に用いられている。システインの製法については蛋白分解法や半合成法などが知られているが、現在主に用いられている方法は蛋白分解法と半合成法である。システインを食品の風味改善に用いることを目的として、システイン含量の高い天然食品素材が求められているが、そのような天然食品素材は従来ほとんど知られていなかった。

一方、システインにグルタミン酸及びグリシンが結合したトリペプチドであるグルタチオンも、食品の風味改善に用いることが知られている。グルタチオンは、システインから、γ-グルタミルシステインを介して合成される。しかし、γ-グルタミルシステインを食品の風味改善に用いることはほとんど行われていない。

γ-グルタミルシステインは、γ-グルタミルシステイン合成酵素（GSH1）により、システインとグルタミン酸から合成される。そして、グルタチオンは、γ-グルタミルシステインとグリシンから、グルタチオン合成酵素（GSH2）により合成される。

γ-グルタミルシステイン合成酵素遺伝子のプロモーターが強転写プロモーターΔP8で交換された酵母サッカロマイセス・セレビシエYHT178株は、菌体内でγ-グルタミルシステイン合成酵素を大量に生産することが報告されている（大竹康之ら、バイオサイエンスとインダストリー、第50巻第10号、第989～994頁、1992年）。また、大竹らは、別の報告で、サッカロマイセス・セレビシエのグルタチオン合成酵素遺伝子欠損株YL1株では、グルタチオンが検出されなかったと報

告している（大竹康之ら、Agricultural and Biological Chemistry、第12巻、第54号、第3145～3150頁、1990年）。

井上らは、染色体上のグルタチオン合成酵素遺伝子の遺伝子破壊について報告している（Yoshiharu Inoueら、Biochimica et Biophysica Acta、第1395号、第315～320頁、1998年）。この破壊遺伝子は、396位のアミノ酸残基までは正確に翻訳され、397位以降のC末端側領域を欠失したグルタチオン合成酵素をコードしていると考えられる。井上らは、遺伝子破壊株のグルタチオン含量を測定したがグルタチオンは検出されなかったと報告している。

ところで、 γ -グルタミルシステインに糖類を添加して加熱することによりフレーバー組成物が得られることが知られている（特開平4-91762号公報）が、 γ -グルタミルシステインを加熱するとシステインが遊離することは知られていない。

発明の開示

上記のように、 γ -グルタミルシステイン合成酵素の発現の増強、及び、グルタチオン合成酵素遺伝子の破壊に関する報告がある。しかし、いずれの場合にも、取得されたサッカロマイセス・セレビシエは、 γ -グルタミルシステイン含量が低いか、あるいは生育がよくないものであり、工業生産に必要な条件を十分に満足するものとはいえない。

γ -グルタミルシステイン合成酵素の発現が増強されたYHT178株は、最小合成培地において最大1.69%の γ -グルタミルシステインを菌体内に蓄積し得ると報告されている（前出、大竹ら、バイオサイエンスとインダストリー）。この培地における酵母の増殖速度は報告されておらず、最小合成培地よりも栄養源に富んだYPD培地での増殖速度が報告されているが、YPD培地においてさえ工業レベルで必要な増殖速度に達しているとはいえない。

また、グルタチオン合成酵素遺伝子が破壊されたYL1株の報告されている γ -グルタミルシステイン含有量は0.533%と少なく、工業レベルの実用に耐え得るものでもない（前出、大竹ら、Agric. Biol. Chem.）。なお、クリスら（Chris M. Grantら、Molecular Biology of the Cell、第8巻、第1699～1707頁、1997年）

は、YL1株の表現型がグルタチオン合成酵素を部分的に弱めたものと一致するので、グルタチオン合成酵素を完全に欠落させたものではないと指摘している。しかし、YL1株は、グルタチオンを含む培地と含まない培地における対数増殖期の増殖能が大きく異なっているので、本件発明のグルタチオン合成酵素弱化株とは本質的に異なる。

また、井上ら（前出）が作製したグルタチオン合成酵素遺伝子破壊株についてグルタチオン含有量を測定した結果、グルタチオンは検出されなかったと報告されている。

このような技術背景の下に、本発明は、システインと同様に食品の風味改善に実用的に用いることができる天然食品素材を提供すること、具体的には、工業レベルでの生産にも適用可能であり、かつ、γ-グルタミルシステインの蓄積量の多い酵母及びその酵母を用いて製造される酵母エキスを提供することを課題とする。

本発明者らは、γ-グルタミルシステインを加熱するとシステインが遊離することを見出し、γ-グルタミルシステインを含有する天然食品素材を加熱すれば、システインを含有する天然食品素材と同様に用いられる天然食品素材を製造することができる考えた。そこで、γ-グルタミルシステインを高含有する酵母を育種することを目指し、グルタチオン合成酵素遺伝子の破壊を試みたが、満足できる結果は得られなかった。さらに、鋭意検討を行った結果、γ-グルタミルシステインを高含有し、かつ、生育の良好な菌株を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

（１）サッカロマイセス・セレビシエの野生株よりもグルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地で培養したとき、その対数増殖期に、γ-グルタミルシステインを１重量％以上含有することができ、かつ、グルタチオンを０．００４重量％～０．１重量％の範囲で含有するサッカロマイセス・セレビシエ。

（２）前記サッカロマイセス・セレビシエの野生株よりもグルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地が、グルタチオンを含まない培地、又は、グルタチオン、γ-グルタミルシステイン、L-システイン及びシスチンを含まない培地である

(1) のサッカロマイセス・セレビシエ。

(3) 前記培地が最小培地である(2) のサッカロマイセス・セレビシエ。

(4) 染色体上のグルタチオン合成酵素遺伝子によってコードされるグルタチオン合成酵素が、370位のアルギニン残基以降のC末端側の領域を欠失していることを特徴とするサッカロマイセス・セレビシエ。

(5) (1) ~ (4) のいずれかのサッカロマイセス・セレビシエを好適な培地で培養し、得られた菌体を用いて製造された酵母エキス。

(6) サッカロマイセス・セレビシエのグルタチオン合成酵素遺伝子を遺伝子組換え法によって改変した組換え体を作製し、サッカロマイセス・セレビシエの野生株よりもグルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地で培養したとき、その対数増殖期にグルタチオンを0.004重量%~0.1重量%の範囲で含有する組換え体を選択することを特徴とする γ -グルタミルシステインを含有するサッカロマイセス・セレビシエの育種方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

前記したように、本発明は第一に、 γ -グルタミルシステインを加熱するとシステインが得られるという知見に基づいている。 γ -グルタミルシステインをpH1~7において50~120°Cで3~300分加熱すると、 γ -グルタミルシステインはシステインとPCA(ピロリドンカルボン酸)に分解するため、システインが全体として高収率で得られる。尚、以降、「システイン」というときは、L-システインとその酸化型ジスルフィドであるシスチンの両者をいうことがある。

本発明のサッカロマイセス・セレビシエは、上記知見に基づき、食品の風味改善等を目的として作製されたものである。本発明のサッカロマイセス・セレビシエは、サッカロマイセス・セレビシエの野生株よりもグルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地で培養したとき、その対数増殖期に、 γ -グルタミルシステインを固形成分に占める割合で1重量%以上含有する。尚、本発明において、 γ -グルタミルシステイン又はグルタチオンの含有量は、菌体の固形成分、例えば、105°Cで4時間加熱した後の菌体重量に対する γ -グルタミルシステイン又はグルタチオンの含有量(%)をいう。

また、本発明のサッカロマイセス・セレビスエは、サッカロマイセス・セレビスエの野生株よりもグルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地で培養したとき、その対数増殖期に、 γ -グルタミルシステインを1重量%以上、好ましくは1.7重量%以上含有することができ、かつ、グルタチオンを0.004重量%~0.1重量%の範囲、好ましくは0.004重量%~0.01重量%の範囲で含有する。後記実施例に示すように、本発明のサッカロマイセス・セレビスエは、グルタチオンを微量産生し、グルタチオンを含まない培地においてグルタチオン合成酵素欠損株よりも良好な生育を示す。ここで、本発明のサッカロマイセス・セレビスエのごとく、前記培地で0.004重量%~0.1重量%のグルタチオンを産生する程度の微弱なグルタチオン合成酵素活性を有する株を、「グルタチオン合成酵素弱株」ということがある。これに対し、「グルタチオン合成酵素欠損株」とは、グルタチオン合成酵素活性を実質的に欠損し、最小培地でグルタチオンを産生できない株をいう。また、本発明において、「対数増殖期」とは、培養中におけるサッカロマイセス・セレビスエの細胞数が培養時間に対して対数的に増加する時期をいう。尚、 γ -グルタミルシステイン含有量は、対数増殖期のすべてにわたって1重量%以上である必要はなく、少なくとも対数増殖期の任意の時点において、好ましくは、対数増殖期の次に述べる状態で1重量%以上であればよい。即ち、前記状態とは、対数増殖期から定常状態になったときの培養液の吸光度の1/2以上の吸光度を有する対数増殖期である。

上述したように、本発明のサッカロマイセス・セレビスエは、 γ -グルタミルシステインを一定量以上産生し、かつ、グルタチオンが存在しないような工業的に用いられる培地における生育も良好であるので、単位時間あたりの γ -グルタミルシステインの生産能に優れ、 γ -グルタミルシステインを含有する酵母エキスの効率的な製造に適している。また、得られた酵母エキスを加熱することによって、システイン高含有酵母エキスを製造することができる。

サッカロマイセス・セレビスエの野生株、すなわちグルタチオン合成酵素活性を有し、グルタチオンを産生する株よりも、グルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地としては、例えば、グルタチオンを含まない培地、あるいは、グルタチオン、 γ -グルタミルシステイン、L-システイン及びシスチンを含まない培

地が挙げられる。具体的には、S D培地等の各種の最小培地が挙げられる。本発明のサッカロマイセス・セレビスエが上記の性質以外の栄養要求性を有する場合は、前記培地は、栄養要求性に応じた栄養成分、例えばシステイン以外の各種アミノ酸、ヌクレオチド、ビタミン等を必要に応じて含む。

本発明のサッカロマイセス・セレビスエとして具体的には、染色体上のグルタチオン合成酵素遺伝子によってコードされるグルタチオン合成酵素が、370位のアルギニン残基以降のC末端側の領域を欠失したサッカロマイセス・セレビスエ、つまり、370位以下を欠失したグルタチオン合成酵素を産生するサッカロマイセス・セレビスエが挙げられる。

前出の井上らの報告 (Yoshiharu Inoueら、*Biochimica et Biophysica Acta*、第1395号、第315～320頁、1998年) からは、396番目のアミノ酸残基までを含み、397番目のアミノ酸残基以降を欠失したグルタチオン合成酵素は、活性を欠損していると考えられた。したがって、グルタチオン合成酵素構造遺伝子の396番目のコドンよりも上流のコドンを終始コドンに置換した場合は、発現産物はグルタチオン合成酵素活性を示さないと予想された。しかしながら、後記実施例に示すように、370番目のコドンを終始コドンに置換したグルタチオン合成酵素遺伝子を用いて作製した遺伝子置換株は、微量のグルタチオンを産生したことから、微弱なグルタチオン合成酵素活性を有していることが示唆された。

本発明のサッカロマイセス・セレビスエは、上記知見にしたがって、菌体のグルタチオン合成酵素活性を弱化させることによって取得することができる。グルタチオン合成酵素活性を弱化させるには、例えば、グルタチオン合成酵素遺伝子のプロモーターを、同遺伝子固有のプロモーターから他の遺伝子由来の弱いプロモーターに置換する、グルタチオン合成酵素遺伝子のプロモーター又はコード領域を改変して発現もしくは活性又はその両方を弱める、あるいは、同遺伝子の転写因子活性を弱める、等の方法が挙げられる。

グルタチオン合成酵素遺伝子配列の改変は、通常の変異処理、例えばUV照射、あるいはN-メチル-N-ニトロソグアニジン (NTG)、エチルメタンスルホネート (EMS)、亜硝酸、アクリジン等の変異剤による処理によって、又は、遺伝子組換え技術を利用した遺伝子置換によって、行うことができる。

遺伝子置換は、以下のようにして行うことができる（図4参照）。微弱な活性を有するグルタチオン合成酵素をコードするように改変したグルタチオン合成酵素遺伝子、例えば370番目のコドンを終始コドンに改変したグルタチオン合成酵素遺伝子（弱化型グルタチオン合成酵素遺伝子）を含む組換えDNAでサッカロマイセス・セレビスエを形質転換し、弱化型グルタチオン合成酵素遺伝子と染色体上のグルタチオン合成酵素遺伝子との間で組換えを起こさせる。その際、プラスミドには、宿主の栄養要求性等の形質にしたがって、マーカー遺伝子を含ませておくことで操作がしやすい。また、前記組換えDNAは、プラスミドを用いて作製した後に制限酵素で切断して直鎖状にし、さらに、サッカロマイセス・セレビスエで機能する複製制御領域を除いておくことで、染色体に組換えDNAが組み込まれた株を効率よく取得することができる。

上記のようにして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するグルタチオン合成酵素遺伝子配列との組換えを起こし、正常なグルタチオン合成酵素遺伝子と弱化型グルタチオン合成酵素遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分及びマーカー遺伝子）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では正常なグルタチオン合成酵素遺伝子が機能する。

次に、染色体DNA上に欠失型グルタチオン合成酵素遺伝子のみを残すために、2個のグルタチオン合成酵素遺伝子の組換えにより1コピーのグルタチオン合成酵素遺伝子を、ベクター部分（マーカー遺伝子を含む）とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なグルタチオン合成酵素遺伝子が染色体DNA上に残され、弱化型グルタチオン合成酵素遺伝子が切り出される場合と、反対に弱化型グルタチオン合成酵素遺伝子が染色体DNA上に残され、正常なグルタチオン合成酵素遺伝子が切り出される場合がある。いずれの場合もマーカー遺伝子が脱落するので、2回目の組換えが生じたことは、マーカー遺伝子に対応する表現形質によって確認することができる。また、目的とする遺伝子破壊株は、PCRによりグルタチオン合成酵素遺伝子を増幅し、その構造を調べることによって、選択することができる。

サッカロマイセス・セレビスエの形質転換は、プロトプラスト法、KU法、K

UR法、エレクトロポレーション法等、通常酵母の形質転換に用いられる方法を採用することができる。

上記と同様にして、プロモーターなどの発現調節配列を改変することもできる。また、本発明のサッカロマイセス・セレビスエは、微弱なグルタチオン合成酵素活性を有することに加えて、 γ -グルタミルシステイン合成酵素活性が増強されている。

本発明のサッカロマイセス・セレビスエ又はその作製に用いる親株は、1倍体でも2倍体でも、それ以上の倍数体でもよい。

上記のようにして改変したサッカロマイセス・セレビスエについて、サッカロマイセス・セレビスエの野生株よりもグルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地で培養したとき、その対数増殖期にグルタチオンを0.004重量%~0.1重量%の範囲で含有する組換え体を選択することにより、本発明のサッカロマイセス・セレビスエを取得することができる。

本発明のサッカロマイセス・セレビスエを好適な培地で培養し、得られた菌体を用いて、 γ -グルタミルシステインを含有する酵母エキスを製造することができる。また、得られた酵母エキスを加熱することにより、システイン含量の高い酵母エキスを製造することができる。

酵母エキスの製造に用いる培地は、本発明のサッカロマイセス・セレビスエが良好に生育し、かつ、 γ -グルタミルシステインを効率よく産生するものであれば特に制限されない。特に、本発明のサッカロマイセス・セレビスエは、グルタチオンを含まない培地でも良好に生育することができるので、通常、工業的に用いられる培地を用いることができる。尚、必要に応じて、用いる菌株の形質にしたがって必要な栄養素を培地に添加する。

培養条件及び酵母エキスの調製は、通常のサッカロマイセス・セレビスエの培養、及び酵母エキスの調製と同様にして行えばよい。酵母エキ스는、酵母菌体を熱水抽出したものを処理したものでもよいし、酵母菌体を消化したものを処理したものでもよい。

図面の簡単な説明

図1は、pH 3における加熱処理によるγ-グルタミルシステインからのシステインの遊離を示す図である。PCAはピロリドンカルボン酸を、Total Cysteineは総システイン量を、γ-Glu-Cysはγ-グルタミルシステインを、各々示す（図2も同様）。

図2は、pH 5における加熱処理によるγ-グルタミルシステインからのシステインの遊離を示す図である。

図3は、弱化型グルタチオン合成酵素遺伝子置換用カセット（カセット2）を含むプラスミドGSH2Mdash/pYES2dashの構築を示す図である。

図4は、カセット2を用いたグルタチオン合成酵素遺伝子の遺伝子置換を模式的に示す図である。

図5は、Nα 3株のSD培地又は1mMのグルタチオンを含むSD培地（必要量のウラシルを含む）での生育（OD₆₆₀）を示す図である。

図6は、Nα 2株及びNα 3株のSD培地（必要量のウラシルを含む）における生育を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

< 1 > 加熱処理によるγ-グルタミルシステインからのシステインの遊離

還元型γ-グルタミルシステインの1mmol濃度の水溶液（pHは3又は5に調整した）を98℃で加熱し、生成物を経時的に調べた。その結果、図1、2に示すように、加熱によりγ-グルタミルシステインがシステインとピロリドンカルボン酸（図1及び図2中、「PCA」と示す）に分解し、システインが高収率で得られることが判明した。

< 2 > グルタチオン合成酵素遺伝子破壊株の構築

次に、グルタチオン合成酵素遺伝子破壊株の構築を行った。

（1）ウラシル要求性のサッカロマイセス・セレビシエの単離

自然界より単離したサッカロマイセス・セレビシエから、常法に従って1倍体Nα株を取得した。Nα株から、ウラシルを含むSDF0Aプレート（2%精製寒天、

最終濃度で50mg/Lのウラシル及び1g/Lの5-フルオロオロチン酸一水和物を含むSD培地)を用いて、ウラシル要求性株N α 1株を取得した。後述するように、N α 1株のウラシル要求性はURA3遺伝子で相補されたことから、URA3遺伝子の変異株であると考えられる。

(SD培地組成)

グルコース 2 %

Nitrogen Base 1 倍濃度

(10倍濃度Nitrogen Baseは、1.7gのBacto Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate (Difco社)と5gの硫酸アンモニウムを混合したものを100mlの滅菌水に溶解し、pHを5.2程度に調整し、フィルター濾過滅菌したもの)

(2) グルタチオン合成酵素欠損用カセットの作製

N α 1株を親株として、グルタチオン合成酵素遺伝子破壊株を構築した。

まず、N α 1株の染色体DNAを鋳型として、グルタチオン合成酵素(GSH2)遺伝子の上流領域から末端領域までをPCR法により増幅した。PCR反応は、下記に示す組成の反応液を用いて、94°C 1分の後、94°C 30秒、60°C 40秒、74°C 1分30秒を30サイクル繰り返すことにより行った。

(PCR反応液組成)

染色体DNA溶液	1 μ l
10X PCR緩衝液	10 μ l
10mM dNTPs	10 μ l
10pmol/ μ l GAL11F (配列番号1)	1 μ l
10pmol/ μ l GSH2R3 (配列番号2)	1 μ l
精製水	76 μ l
KOD Dash (TOYOBO社) *	1 μ l
合計	100 μ l

(* : PCR用ポリメラーゼ)

上記のようにして増幅したGSH2遺伝子断片を、製造者の指示に従ってプラスミ

トpGEM-T Easy (Promega社)に連結し、GSH2/pGEMを得た。

一方、選択遺伝子マーカーとして、URA3遺伝子を、同遺伝子を含むプラスミドpYES2 (Invitrogen社)を鋳型とするPCRによって取得した。PCR反応は、下記に示す組成の反応液を用いて、94°C 1分の後、94°C 30秒、52°C 30秒、74°C 40秒を30サイクル繰り返すことにより行った。

(PCR反応液組成)

10ng/ μ l pYES2	1 μ l
10X PCR緩衝液	10 μ l
10mM dNTPs	10 μ l
10pmol/ μ l URA3F2 (配列番号 3)	1 μ l
10pmol/ μ l URA3R2 (配列番号 4)	1 μ l
精製水	76 μ l
KOD Dash	1 μ l
合計	100 μ l

続いて、GSH2/pGEMを制限酵素MunIで切断し、末端を平滑化した。その切断末端に、制限酵素SmaIで末端を平滑化したURA3遺伝子断片を連結し、プラスミドURA3-GSH2/pGEMを作製した。このURA3-GSH2/pGEMを鋳型として、GSH2遺伝子の両端に相当する配列を有するプライマーを用いてPCRを行い、カセット1を調製した。PCR反応は、下記に示す組成の反応液を用いて、94°C 1分の後、94°C 30秒、56°C 30秒、74°C 1分を30サイクル繰り返すことにより行った。

(PCR反応液組成)

10ng/ μ l URA3-GSH2/pGEM	1 μ l
10X PCR緩衝液	10 μ l
10mMdNTPs	10 μ l
10pmol/ μ l GAL11F (配列番号 1)	1 μ l
10pmol/ μ l GSH2R (配列番号 5)	1 μ l
精製水	76 μ l

12

KOD Dash	1 μ l
合計	100 μ l

(3) グルタチオン合成酵素遺伝子欠損株の取得

以上の方法で作製したカセット 1 を用いて、N α 1 株のグルタチオン合成酵素遺伝子の破壊を行った。N α 1 株を前培養した後に、培養物を 50ml の YPD 培地に植え継ぎ、対数増殖期まで培養した。培養菌体を 1 M ソルビトールに懸濁し、カセット 1 を混和して、エレクトロポレーションにより形質転換を行った。形質転換株を 1mM のグルタチオンを含む SD プレートで培養し、生育する株を選択した。PCR、及び後述するように菌体のグルタチオン含量を測定することによって、グルタチオン合成酵素遺伝子がカセット 1 で置換された株を選択し、N α 2 株を得た。

上記のようにして作製された N α 2 株は、グルタチオン合成酵素遺伝子のコード領域の 1 1 番目のコドン以降に URA3 遺伝子断片由来の配列が付加されているため、グルタチオン合成酵素遺伝子は 1 1 番目のアミノ酸残基までしか正確に翻訳されない。

< 3 > グルタチオン合成酵素弱化株の構築

次に、弱化型グルタチオン合成酵素遺伝子置換株の作製を行った。

(1) 弱化型グルタチオン合成酵素遺伝子置換用カセットの作製

N α 1 株のグルタチオン合成酵素遺伝子断片を、PCR 法により増幅した。PCR 反応は、下記に示す組成の反応液を用いて、98°C 10 秒の後、98°C 10 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分を 30 サイクル繰り返すことにより行った。

(PCR 反応液組成)

酵母染色体	1 μ l
Pyrobest DNA Polymerase(宝酒造)	0.5 μ l
10X PCR 緩衝液	10 μ l
10mM dNTPs	8 μ l
20pmol/ μ l GSH2F7 (配列番号 6)	2 μ l
20pmol/ μ l GSH2R7 (配列番号 7)	2 μ l

精製水	76.5 μ l
合計	100 μ l

上記のようにして増幅した遺伝子断片を精製し、以下の条件で72°Cで10分間酵素反応を行うことにより、末端にAを付加した。

(反応液組成)

遺伝子断片溶液	5 μ l
10X PCR緩衝液(MgCl ₂ フリー)	10 μ l
25mM MgCl ₂	3 μ l
2.5mM dATP	5 μ l
Taq DNA polymerase (宝酒造)	0.5 μ l
精製水	31.5 μ l
合計	50 μ l

この反応産物を、製造者の指示に従ってプラスミドpGEM-T Easy (Promega社)のに連結し、プラスミドGSH2dash/pGEMを得た。

次に、部位特異的変異法によって、GSH2dash/pGEMに含まれるグルタチオン合成酵素遺伝子の370番目のアミノ酸に対応するコドンを終止コドンに置換した。この操作は、QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社)を用い、製造者のプロトコルに従って行った。プライマーは、GSH2M-F1 (配列番号8)、GSH2M-R1 (配列番号9)を用いた。このようにしてプラスミドGSH2Mdash/pGEMを作製した。

一方、プラスミドpYES2 (Invitrogen社)から2 μ oriを除去したプラスミドを作製した。pYES2を制限酵素SspI、NheIで切断し、切断末端を平滑化した後、連結させ、プラスミドpYES2dashを得た。pYES2dash及びGSH2Mdash/pGEMを、いずれも制限酵素SacI及びSphIで切断し、pYES2dashからはURA3遺伝子を含む断片を、GSH2Mdash/pGEMからは変異を有するグルタチオン合成酵素遺伝子断片を切り出し、これらを連結した。このようにしてプラスミドGSH2Mdash/pYES2dashを作製した。GSH2Mdash/pYES2dashを制限酵素MunIで切断し、カセット2を得た(図3)。

(2) 弱化型グルタチオン合成酵素遺伝子置換株の構築

上記のようにして作製したカセット2を用いて、N α 1株のグルタチオン合成酵素遺伝子の遺伝子置換を行った(図4)。N α 1株を前培養した後に、培養物を50mlのYPD培地に植え継ぎ、対数増殖期まで培養した。培養菌体を1Mソルビトールに懸濁し、カセット2を混和して、エレクトロポレーションにより形質転換を行った。形質転換株を1mMのグルタチオンを含むSDプレートで培養し、生育する株を選択した。カセット2が染色体上の目的の位置に組み込まれたことをPCRによって確認し、得られた株をN α 3中間体とした。

次に、図4に示すとおり、弱化型グルタチオン合成酵素遺伝子のみを染色体に残すため、以下の操作を行った。N α 3中間体をYPD培地で培養し、培養産物を1mMのグルタチオンを含むSDF0Aプレートに蒔いた。プレート上に生育してきた株のグルタチオン合成酵素遺伝子の配列を決定し、目的の部位の配列が正しく置換されていることを確認し、N α 3株を得た。

<4> N α 2株及びN α 3株の生育及び γ -グルタミルシステインの産生

上記のようにして取得したN α 2株及びN α 3株の対数増殖期における増殖能を調べた。N α 2株及びN α 3株をYPD培地で前培養した後、培養物を50mlのSD培地(50mg/Lのウラシルを含む)又は1mMのグルタチオンを含むSD培地(50mg/Lのウラシルを含む)培地に植え継ぎ、30°Cで振とう培養した。結果を図5及び6に示す。図5に示されるように、N α 3株は、グルタチオンを含まない培地においてもグルタチオンを含む培地における増殖能とあまり差がみられなかった。また、グルタチオンを含まない培地における対数増殖期における生育は、N α 2株よりもN α 3株の方が良好であった(図6)。

次に、N α 2株とN α 3株の対数増殖期における単位時間あたりの γ -グルタミルシステイン及びグルタチオンの生産量を調べた。N α 2株及びN α 3株をYPD培地で前培養した後、培養物を50mlのSD(必要量のウラシルを含む)培地に植え継ぎ、30°Cで振とう培養した。

γ -グルタミルシステイン及びグルタチオンの生産量は、次のようにして測定した。培養物を遠心することにより菌体を取得し、この菌体を蒸留水で2回洗浄

した後、70℃で10分間の熱水抽出処理に付し、細胞内容物を得た。これを遠心処理し、得られた上清中の γ -グルタミルシステイン及びグルタチオン含量を測定した。また、一定培地中に含まれる酵母菌体を濾紙上に取り、105℃で4時間加熱した後に残った菌体重量を測定し、乾燥菌体重量とした。表1に、乾燥菌体重量当たりの γ -グルタミルシステイン及びグルタチオンの含有量を示す。

表 1

	測定までの** 培養時間	γ -グルタミルシステイン (%)	グルタチオン (%)
N α 2株No.1	約2.6時間	1.752	0
N α 2株No.2	約5.3時間	1.748	0
N α 3株No.1	約1.5時間	1.101	0.0043
N α 3株No.2	約3.8時間	1.117	0.0045

これらの結果から、各々の株の単位時間あたりの γ -グルタミルシステイン生産量を測定した。N α 2株に対するN α 3株の優位性を示すため、N α 2株においては γ -グルタミルシステインの含有量が高い方（N α 2株No.1）を、N α 3株においては γ -グルタミルシステインの含有量が低い方（N α 3株No.1）を用いて計算した。すなわち、N α 2株においては最大値、N α 3株においては最小値が算出される。その結果、N α 2株は0.116mg/時間であり、N α 3株は0.124mg/時間であった。

産業上の利用可能性

本発明のサッカロマイセス・セレビシエは、 γ -グルタミルシステインを一定量以上産生し、かつ、グルタチオンが存在しないような工業的に用いられる培地における生育も良好であり、 γ -グルタミルシステインを含有する酵母エキスの効率的な製造に適している。

請求の範囲

1. サッカロマイセス・セレビスエの野生株よりもグルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地で培養したとき、その対数増殖期に、 γ -グルタミルシステインを1重量%以上含有することができ、かつ、グルタチオンを0.004重量%~0.1重量%の範囲で含有するサッカロマイセス・セレビスエ。

2. 前記サッカロマイセス・セレビスエの野生株よりもグルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地が、グルタチオンを含まない培地、又は、グルタチオン、 γ -グルタミルシステイン、L-システイン及びシスチンを含まない培地である請求項1記載のサッカロマイセス・セレビスエ。

3. 前記培地が最小培地である請求項2記載のサッカロマイセス・セレビスエ。

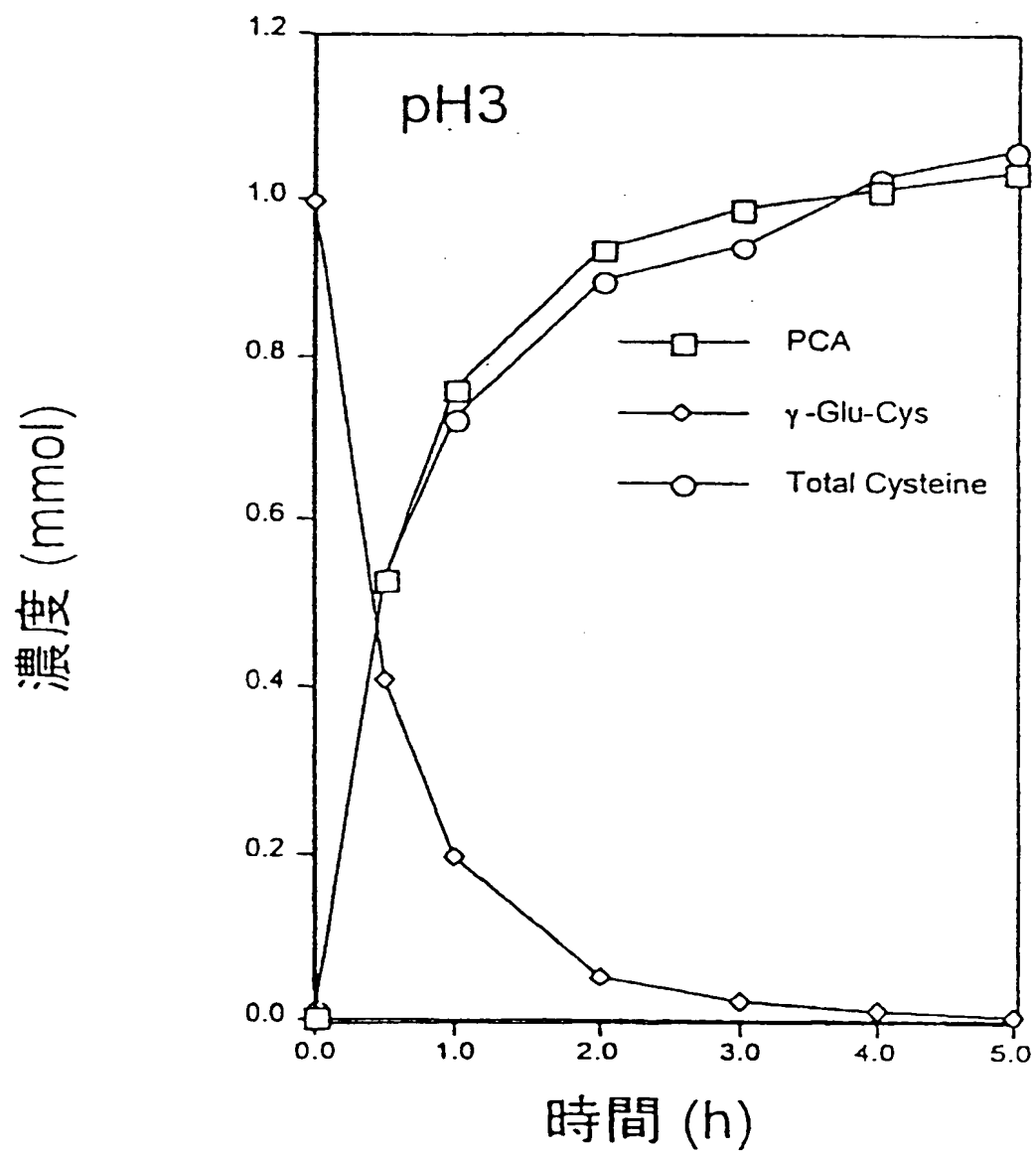
4. 染色体上のグルタチオン合成酵素遺伝子によってコードされるグルタチオン合成酵素が、370位のアルギニン残基以降のC末端側の領域を欠失していることを特徴とするサッカロマイセス・セレビスエ。

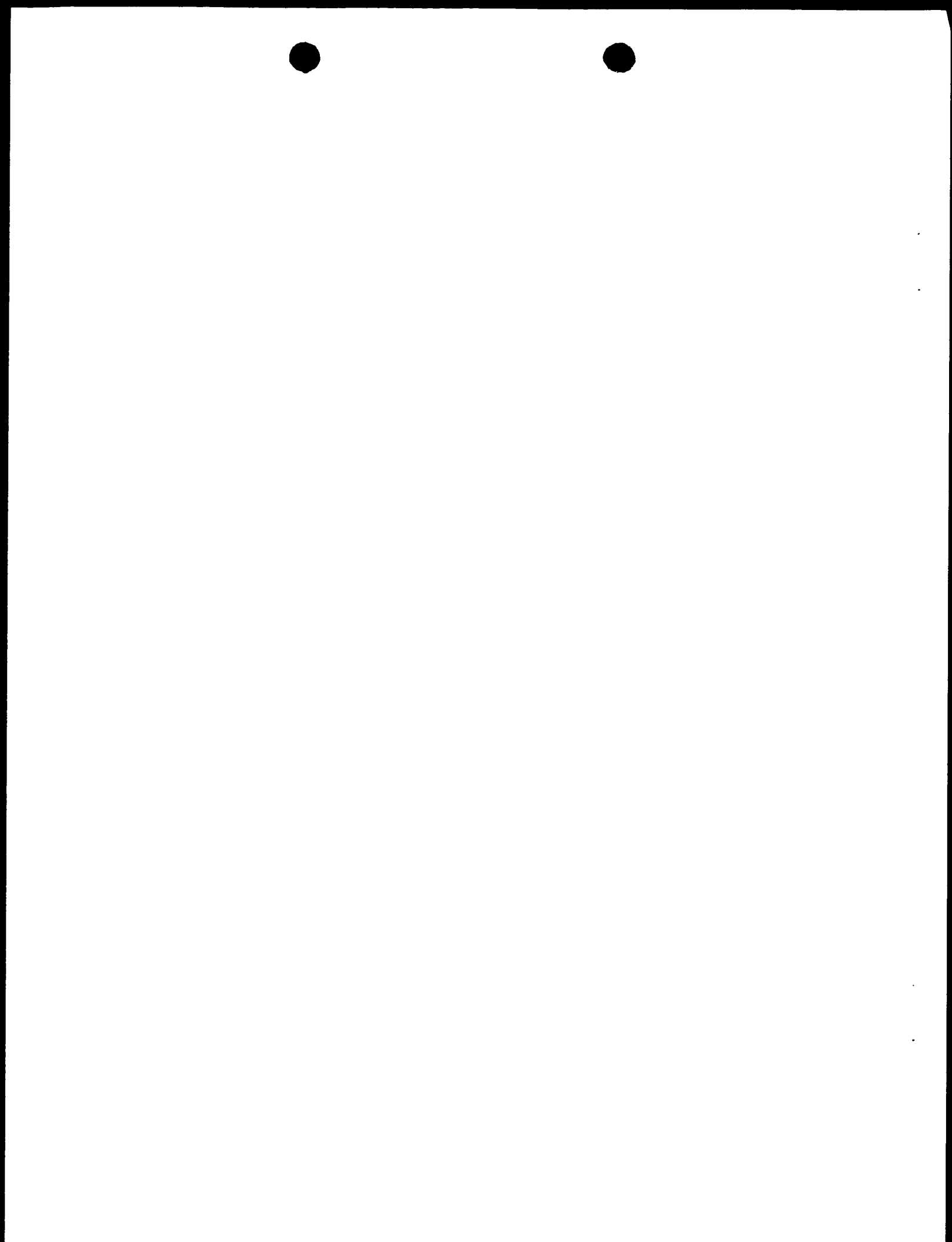
5. 請求項1~4のいずれか一項に記載のサッカロマイセス・セレビスエを好適な培地で培養し、得られた菌体を用いて製造された酵母エキス。

6. サッカロマイセス・セレビスエのグルタチオン合成酵素遺伝子を遺伝子組換え法によって改変した組換え体を作製し、サッカロマイセス・セレビスエの野生株よりもグルタチオン合成酵素欠損株の生育が遅い培地で培養したとき、その対数増殖期にグルタチオンを0.004重量%~0.1重量%の範囲で含有する組換え体を選択することを特徴とする γ -グルタミルシステインを含有するサッカロマイセス・セレビスエの育種方法。

1/6

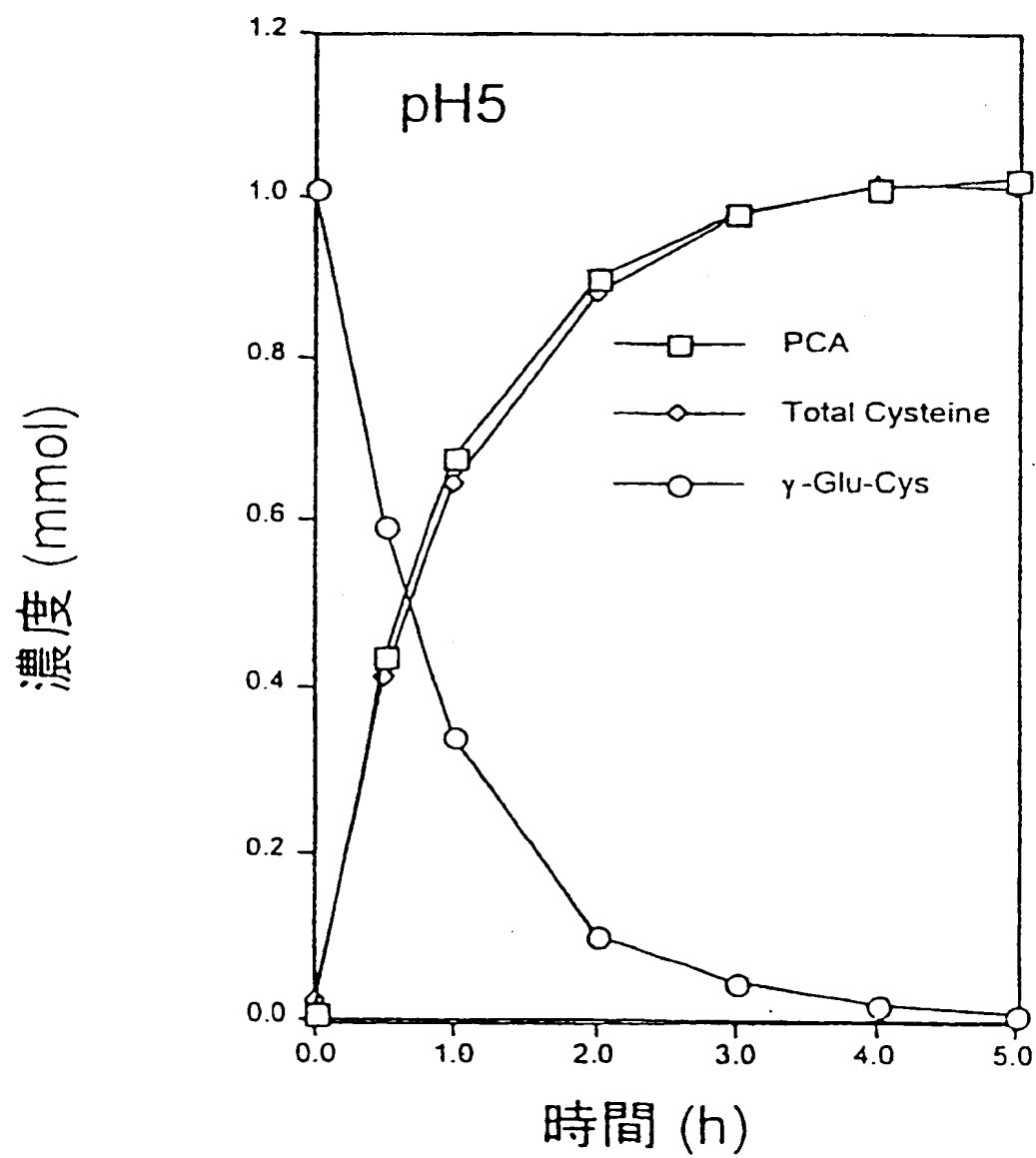
Fig.1





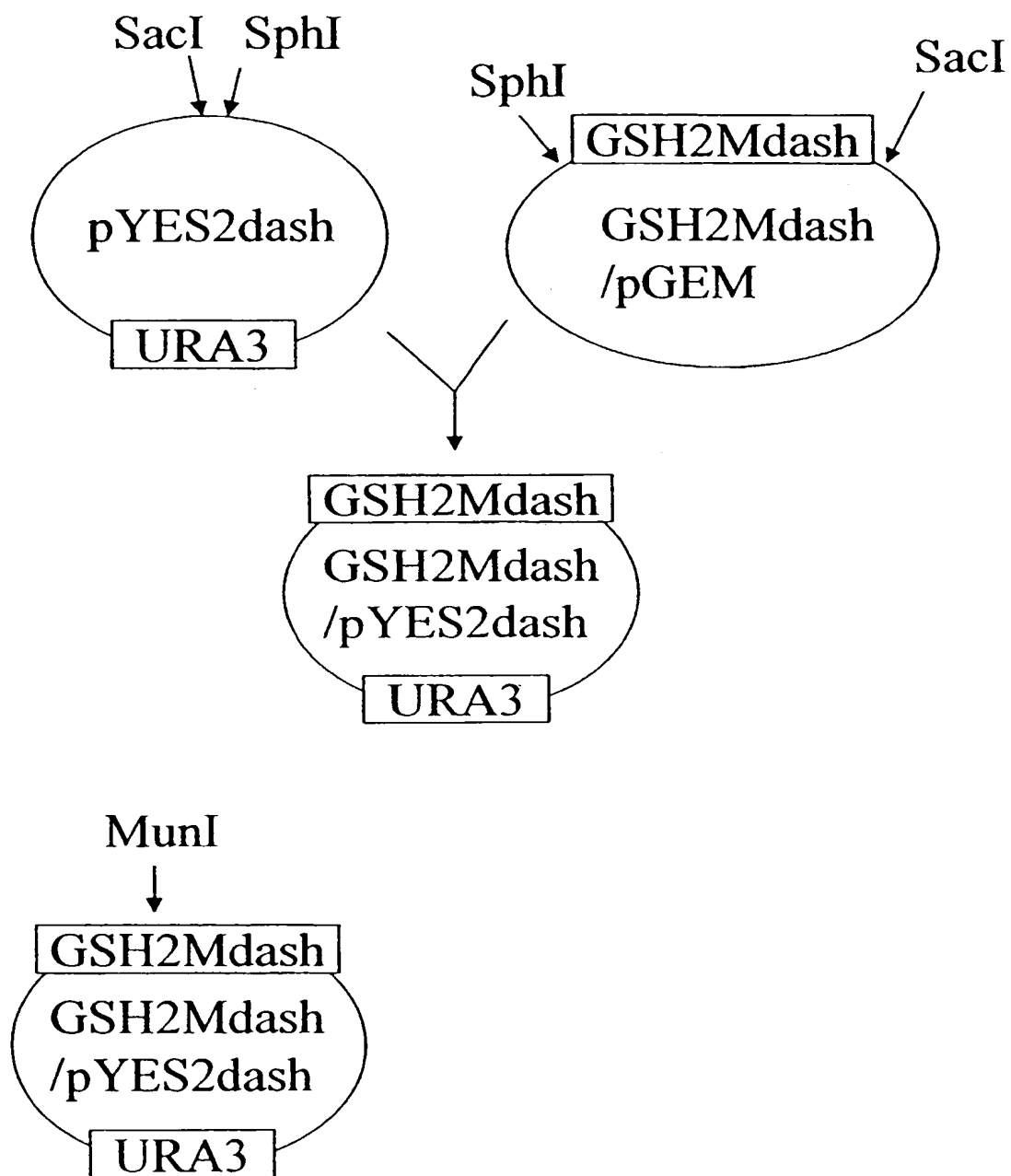
2/6

Fig.2





3/6

*Fig.3*



4/6

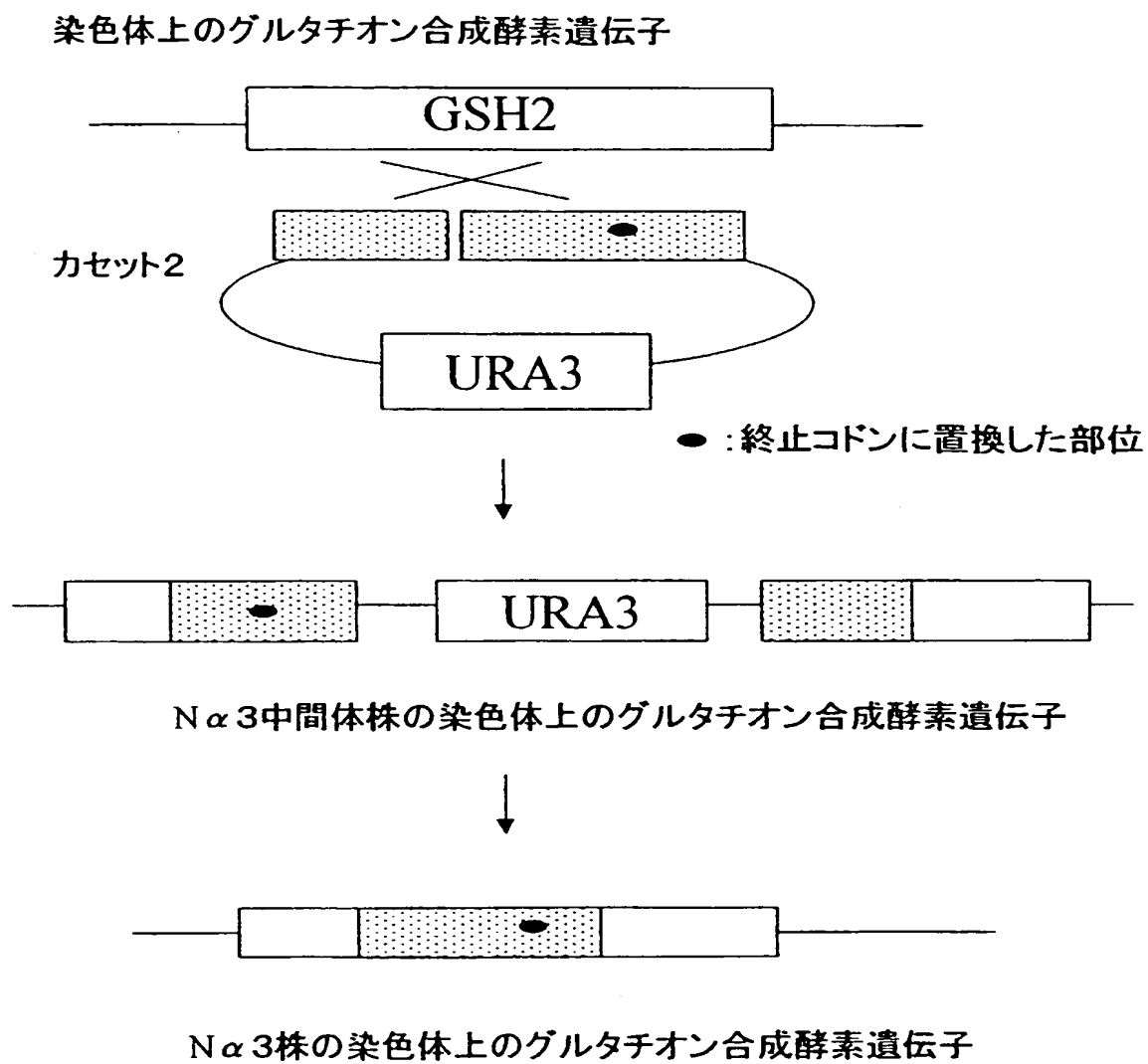
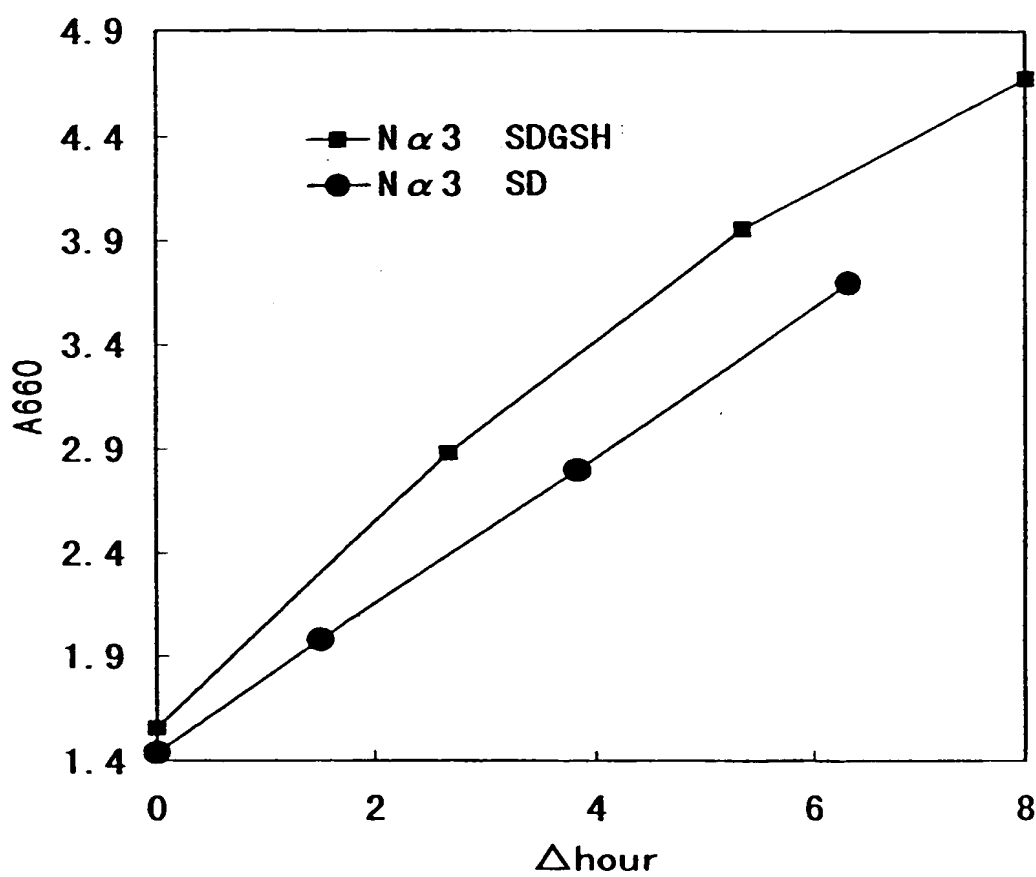


Fig. 4



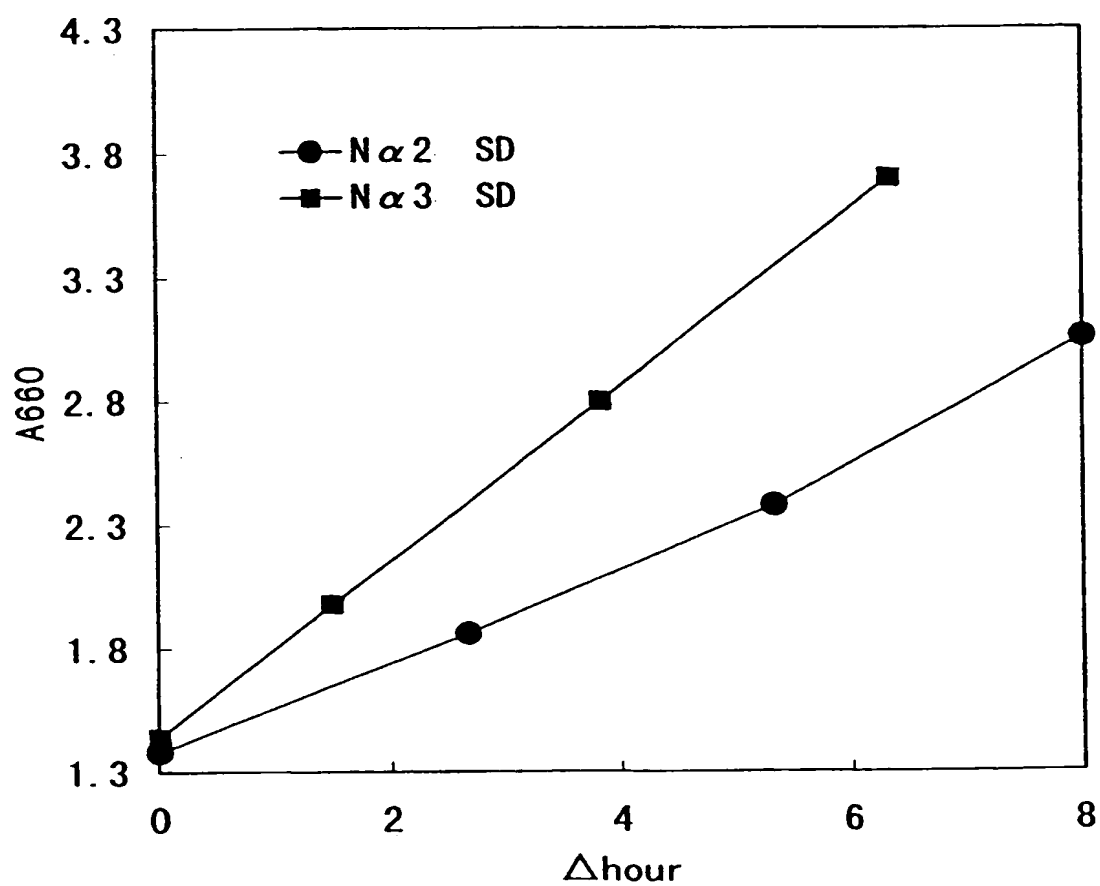
5/6

Fig.5





6/6

Fig.6

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> METHOD FOR PRODUCING γ -GLUTAMYLCYSTEINE

<130> B751SMOP1193

<140>

<141> 2001-05-24

<150> JP 2000-155121

<151> 2000-05-25

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 1

tatgaagact gtacagtctc c

21

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

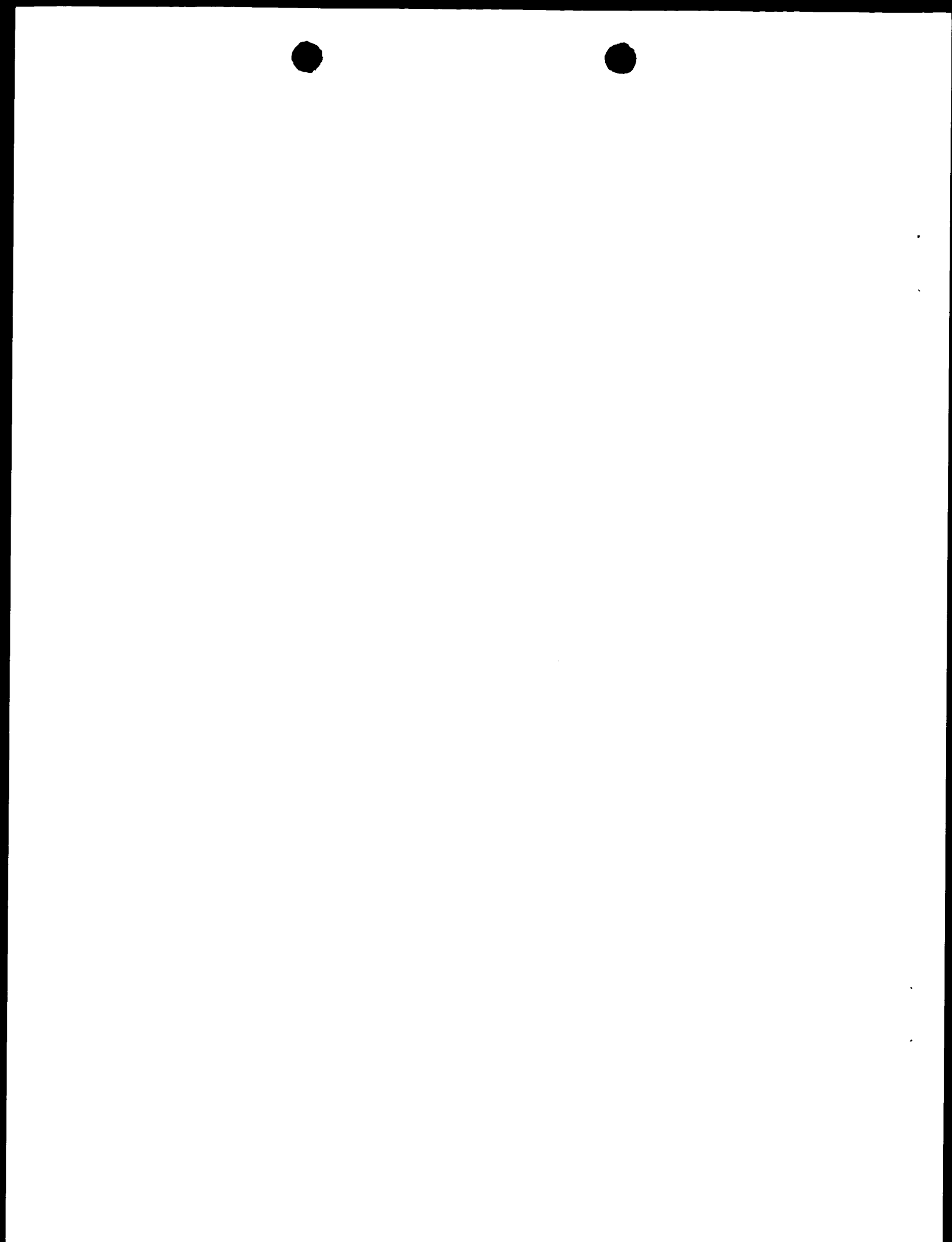
<400> 2

ccggggagct cagctaaatg gtgtacttcg ctac

34

<210> 3

<211> 29



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 3

attaaccggttggattcgg taatctccg 29

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 4

attaaccggtgttttttag ttttgctggc 30

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 5

agctaaatgtgtacttcgc tac 23

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 6

cagattccga gtttactgga 20

<210> 7



<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 7

agaaggaatg agcctaaaac agc

23

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 8

ggcaggggaag gcaagtagct ggcattaagt gagccctc

38

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 9

gagggtcac ttaatgccag ctacttgcc tccctgcc

38



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N1/16, 1/19, 15/52, C12P1/02 // A23L1/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/16-1/19, 15/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	INOUE, Yoshiharu et al., Molecular identification of glutathione synthetase (GSH2) gene from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Biochimica et Biophysica Acta, 11 February, 1998, Volume 1395, Issue 3, pages 315-320	1-6
A	Yasuyuki OOMURA et al., Glutathione kouseisan Koubo no Ikushu, Bio Science to Industry, 01 October, 1992, Vol. 50, No. 10, pp. 989-994	1-6
A	JP 6-70752 A (ASAHI BREWERIES, LTD.), 15 March, 1994 (15.03.94) (Family: none)	1-6
A	OMURA, Fumihiko et al., Single point mutations in Met 4p impair the transcriptional repression of MET genes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , FEBS Letters, June, 1996, Volume 387, Numbers 2,3, pages 179-183	1-6
A	GRANT, Chris M. et al., Glutathione Synthetase Is Dispensable for Growth under Both Normal and	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
23 August, 2001 (23.08.01)Date of mailing of the international search report
04 September, 2001 (04.09.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04366

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Oxidative Stress Conditions in the Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Due to an Accumulation of the Dipeptide γ-Glutamylcysteine, Molecular Biology of the Cell, September, 1997, Volume 8, Number 9, pages 1699-1707</p> <p>SUGIYAMA, Kei-ichi et al., The Yap1p-dependent Induction of Glutathione Synthesis in Heat Shock Response of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, The Journal of Biological Chemistry, 19 May, 2000, Volume 275, Number 20, pages 15535-15540</p>	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N1/16, 1/19, 15/52, C12P1/02 // A23L1/28		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N1/16-1/19, 15/52		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	INOUE, Yoshiharu et al., Molecular identification of glutathione synthetase (<i>GSH2</i>) gene from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Biochimica et Biophysica Acta, February 11, 1998, Volume 1395, Issue 3, pages 315-320	1-6
A	大村康之外, グルタチオン高生産酵母の育種, バイオサイエンスとインダストリー, 1.10月.1992, 第50巻, 第10号, p. 989-994	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	23.08.01	国際調査報告の発送日 04.09.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内田 俊生	4B 8214 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 6-70752 A (アサヒビール株式会社) 15.3月.1994 (15.03.94) (ファミリーなし)	1-6
A	OMURA, Fumihiko et al., Single point mutations in Met4p impair the transcriptional repression of <i>MET</i> genes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , FEBS Letters, June, 1996, Volume 387, Numbers 2,3, pages 179-183	1-6
A	GRANT, Chris M. et al., Glutathione Synthetase Is Dispen- sable for Growth under Both Normal and Oxidative Stress Conditions in the Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Due to an Accumulation of the Dipeptide γ -Glutamylcysteine, Molecular Biology of the Cell, September, 1997, Volume 8, Number 9, pages 1699-1707	1-6
A	SUGIYAMA, Kei-ichi et al., The Yap1p-dependent Induction of Glutathione Synthesis in Heat Shock Response of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , The Journal of Biological Chemistry, May 19, 2000, Volume 275, Number 20, pages 15535-15540	1-6

PCT

國際調查報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号	B751SMOP1193			今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号	PCT/JP01/04366		国際出願日 (日.月.年)	24.05.01	優先日 (日.月.年)	25.05.00
出願人(氏名又は名称)						
味の素株式会社						

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（P C T 1 8 条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
- ☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
- ☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
- ☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
- ☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない（第Ⅰ欄参照）。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している（第Ⅱ欄参照）。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
- ☐ 第三欄に示されているように、法施行規則第47条（PCT規則38.2(b）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 5 図とする。☒ 出願人が示したとおりである。 ☐ なし
- ☐ 出願人は図を示さなかった。
- ☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/16, 1/19, 15/52, C12P1/02 // A23L1/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/16-1/19, 15/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	INOUE, Yoshiharu et al., Molecular identification of glutathione synthetase (<i>GSH2</i>) gene from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Biochimica et Biophysica Acta, February 11, 1998, Volume 1395, Issue 3, pages 315-320	1-6
A	大村康之外, グルタチオン高生産酵母の育種, バイオサイエンスとインダストリー, 1.10月.1992, 第50巻, 第10号, p. 989-994	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.08.01

国際調査報告の発送日

04.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員) へ

内田 俊生

4B

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 6-70752 A (アサヒビール株式会社) 15.3月.1994 (15.03.94) (ファミリーなし)	1-6
A	OMURA, Fumihiko et al., Single point mutations in Met4p impair the transcriptional repression of <i>MET</i> genes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , FEBS Letters, June, 1996, Volume 387, Numbers 2,3, pages 179-183	1-6
A	GRANT, Chris M. et al., Glutathione Synthetase Is Dispen- sable for Growth under Both Normal and Oxidative Stress Conditions in the Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Due to an Accumulation of the Dipeptide γ -Glutamylcysteine, Molecular Biology of the Cell, September, 1997, Volume 8, Number 9, pages 1699-1707	1-6
A	SUGIYAMA, Kei-ichi et al., The Yap1p-dependent Induction of Glutathione Synthesis in Heat Shock Response of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , The Journal of Biological Chemistry, May 19, 2000, Volume 275, Number 20, pages 15535-15540	1-6

